

Zastosowanie modeli *in vitro* w przedklinicznych badaniach bezpieczeństwa nowych kandydatów na leki

Katarzyna Kłaś, Piotr Guzy, Kamil Piska, Katarzyna Wójcik-Pszczola, Paulina Koczurkiewicz, Elżbieta Pękala

Zakład Biochemii Farmaceutycznej, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Kraków

Adres do korespondencji: Paulina Koczurkiewicz, Zakład Biochemii Farmaceutycznej, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, ul. Medyczna 9, 30-688 Kraków, e-mail: paulina.koczurkiewicz@gmail.com

Prawo regulujące proces rejestracji leków zakłada, że każda substancja o charakterze potencjalnego środka leczniczego musi być poddana badaniom bezpieczeństwa jeszcze przed rozpoczęciem fazy badań klinicznych. Sama ocena bezpieczeństwa obejmuje zarówno badanie aktywności mutagennej i genotoksycznej, które wykluczają ewentualny wpływ substancji na materiał genetyczny, jak również określenie toksyczności narządowej [1]. Dyrektywa 2010/63/UE z 22 września 2010 r. w sprawie ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych (Dz.U. UE L 276/33 z 20.10.2010) bardzo wyraźnie podkreśla rolę metod *in vitro* i wykorzystania ich do oceny bezpieczeństwa kandydatów na leki.

Metody alternatywne to metody wykorzystujące modele *in vitro*, zgodne z zasadą 3R (*replacement* – zastąpienie, *reduction* – redukcja, *refinement* – udoskonalenie) [2]. Zasada ta została sformułowana w 1959 r. przez dwóch uczonych – Williama Russela i Rexa Burcha. Oznacza ona zastępowanie doświadczeń na zwierzętach innymi modelami badawczymi, wykorzystującymi m.in. linie komórkowe, badania *in silico*, ograniczanie liczby zwierząt wykorzystywanych w eksperymentach naukowych do statystycznie koniecznej oraz doskonalenie metod badawczych w celu złagodzenia bólu, cierpienia i stresu zwierząt doświadczalnych [3] (**rycina 1**).

Cytotoksyczność narządowa – testy oparte na komórkach

Hodowle komórkowe *in vitro* to powszechnie wykorzystywany model do określania cytotoksyczności potencjalnych leków, pestycydów czy innych

The application of *in vitro* models in a preclinical safety evaluation of new drug candidates

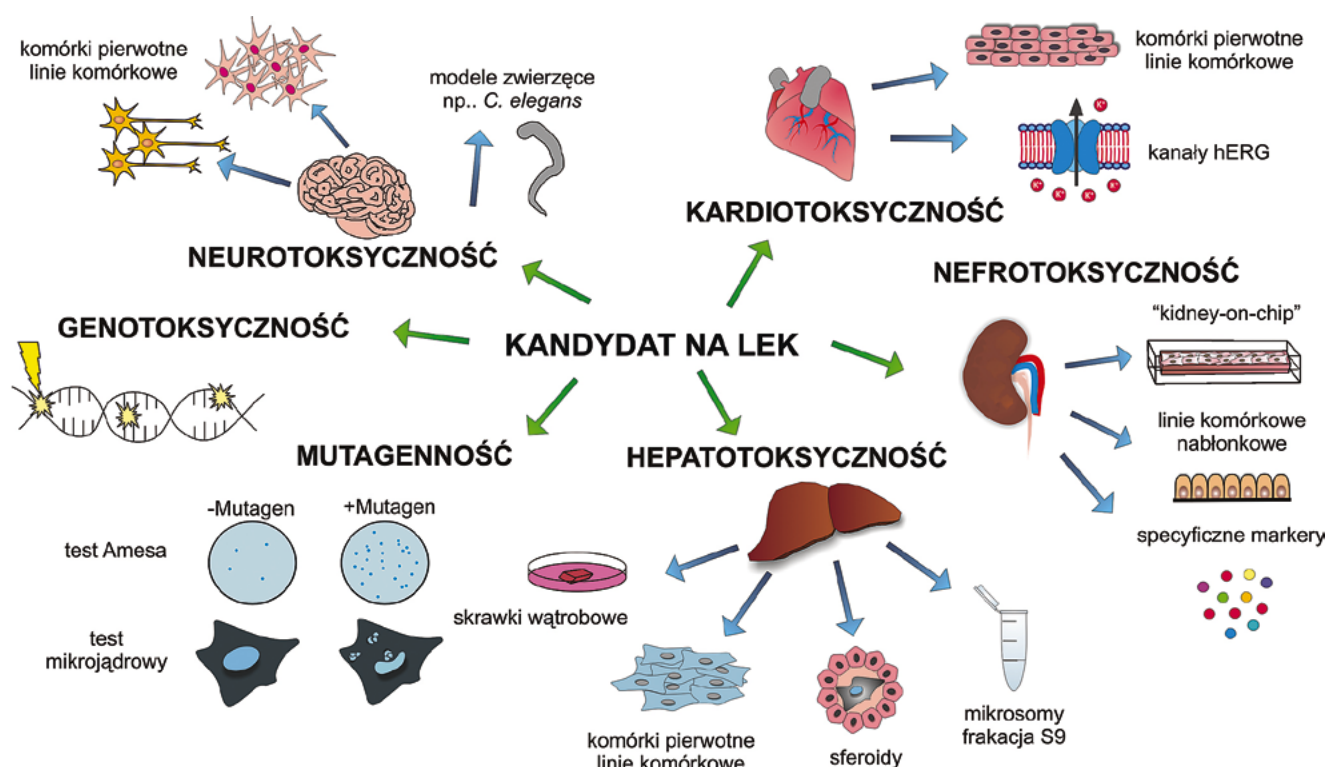
In vitro models are an essential tool to determine the profile of activity and the safety of the drug candidate at the early stage of preclinical studies. Thanks to them it is possible to perform screening tests for thousands of active molecules in a short time and to predict their possible side effect. This allows to eliminate potentially dangerous compounds at a very early stage, before using animal models. This review presents the most important information about using *in vitro* methods, based on prokaryotic and eukaryotic cell models, in hepato-, neuro-, nephro-, cardio- and genotoxicity research of active compounds.

Keywords: alternative models, drug safety, drug development, drug toxicity.

© Farm Pol, 2018, 74(1): 45–51

związków chemicznych [4]. Banki komórkowe zdeponowane w bazach m.in. Amerykańskiej Kolekcji Hodowli Komórkowych, ATCC (*American Type Culture Collection*) czy Europejskiej Kolekcji Zwierzęcych Kultur Komórkowych, ECACC (*European Collection of Animal Cell Cultures*) stanowią komercyjne źródło wielu rodzajów linii komórkowych, hodowli pierwotnych i szczepów bakteryjnych dostępnych dla placówek naukowych na całym świecie [5].

Wykorzystanie hodowli komórkowych jest ważnym etapem procesu odkrywania leków, zapewniającym łatwe, szybkie i opłacalne narzędzie, pozwalające uniknąć kosztownych badań na zwierzętach na dużą skalę. Wyniki tych badań opierają się na analizie komórkowej odpowiedzi na leki [6]. Oceniana jest żywotność komórek (m.in. za pomocą testów MTT i LDH, w których określa się odpowiednio



Rycina 1. Kierunki badań kandydatów na leki na etapie badań przedklinicznych

aktywność dehydrogenaz mitochondrialnych i dehydrogenazy mleczanowej) oraz identyfikowane są mechanizmy oddziaływania potencjalnych leków na komórki.

Większość metod opartych o hodowle *in vitro* wykorzystuje tradycyjne, dwuwymiarowe (2D), jednowarstwowe hodowle komórek na płaskich (plastikowych lub specjalnie modyfikowanych) powierzchniach. Komórki w środowisku *in vivo* są otoczone przez inne komórki i macierz pozakomórkową, co w konsekwencji sprawia, że hodowla komórek 2D nie uwzględnia w wystarczającym stopniu naturalnego mikrośrodowiska. W rezultacie testy wykonane w hodowli komórkowej 2D dostarczają niepełnych danych w porównaniu do

wyników pochodzących z badań *in vivo*, dlatego coraz większą uwagę poświęca się hodowlom trójwymiarowym [7–9].

Zastosowanie zarówno trójwymiarowych hodowli komórkowych, jak i modeli komórek macierzystych i hodowli pierwotnych umożliwia zgromadzenie danych pozwalających na precyzyjną ocenę skuteczności i toksyczności leku, na etapie badań przedklinicznych (tabela 1).

Hepatotoksyczność

Ocena hepatotoksyczności stanowi decydujący krok w rozwoju nowych leków. Wątroba jest organem najbardziej narażonym na

Tabela 1. Porównanie modeli dwu- i trójwymiarowych [8]

Cecha	Hodowla 2D	Hodowla 3D
Morfologia	komórki rosną w monowarstwie	komórki zachowują swój naturalny kształt
Dostępność pożywki hodowlanej i badanych związków	komórki w monowarstwie są jednakowo ekspozycje na składniki odżywcze/czynniki wzrostu/leki, które są rozmieszczone w pożywce hodowlanej	składniki odżywcze i czynniki wzrostu lub leki mogą w pełni nie przeniknąć przez sferoidy do miejsca docelowego
Cykl komórkowy	łatwiejsza synchronizacja hodowli, więcej komórek znajduje się na tym samym etapie cyklu komórkowego, ponieważ są w równym stopniu ekspozycje na czynniki badane	trudna synchronizacja hodowli, komórki w większości znajdują się na różnych fazach cyklu
Ekspresja genów/białek	komórki wykazują różny poziom ekspresji genów i białek w porównaniu do modeli <i>in vivo</i>	komórki wykazują profil ekspresji genów/białek zbliżony do tych w tkankach <i>in vivo</i>
Wrażliwość na leki	komórki są bardzo wrażliwe na działanie leku	komórki są często bardziej odporne na efekty leku w porównaniu z systemami hodowli 2D, dzięki temu są lepszymi wskaźnikami odpowiedzi na leki

toksyczne działanie leków ze względu na jej podstawową rolę w biotransformacji i eliminacji większości ksenobiotyków. Hepatotoksyczność może być spowodowana bezpośrednio działaniem leku lub jego metabolitami powstającymi w wyniku biotransformacji.

W badaniach mechanizmu hepatotoksyczności wywoływanej przez leki wykorzystywane są **biomarkery** stresu komórkowego (np. poziom glutationu, wytwarzanie reaktywnych form tlenu, aktywacja kaskady kaspaz) – powszechnie stosowane do oceny toksyczności komórek w warunkach *in vitro* pochodzących z różnych tkanek. Dodatkowo brane są pod uwagę parametry, które reprezentują specyficzne funkcje wątroby (m.in. ureogeneza, synteza białek, glukoneogeneza, metabolizm glikogenu, synteza VLDL) [10–13].

Najważniejszymi modelami do badań hepatotoksyczności i aktywności metabolicznej *in vitro* są: skrawki wątroby, wyizolowane komórki wątroby (hodowle pierwotne), w tym metody wspólnego hodowania komórek pochodzących z różnych organów (kohodowle), hodowle 3D, frakcje subkomórkowe (mikrosomy) i wątrobowe ustabilizowane linie komórkowe [14].

Linie komórkowe wątroby

Linie komórkowe pochodzące z wątroby używane w badaniu hepatotoksyczności to: Fa2N-4, HepG2, Hep3B, PLC/PRF/5 oraz HepaRG.

Wywodzą się one najczęściej z tkanki nowotworowej. Są atrakcyjnym narzędziem do badań *in vitro* ze względu na wysoką zdolność do proliferacji oraz stabilny metabolizm.

Wykorzystywane są także komórki macierzyste:

- dojrzałe komórki macierzyste pochodzące z wątroby lub z komórek niewątrobowych, np. mezenchymalne komórki macierzyste (MSC);
- pluripotencjalne komórki macierzyste, reprezentowane głównie przez ludzkie embrionalne komórki macierzyste (hESC) i indukowane przez człowieka pluripotencjalne komórki macierzyste (hiPSC), ze względu na ich zdolność do proliferacji i różnicowania w komórki hepatocytopodobne [14, 15].

Hodowle pierwotne

Są złotym standardem wśród modeli komórkowych. Ze względu na pochodzenie z wątroby odzwierciedlają one funkcjonalność ludzkiego narządu *in vivo*. Preparaty są otrzymywane od różnych dawców, przy użyciu indywidualnych izolatów komórek, co daje możliwość analizowania szerokiego zakresu polimorfizmów genetycznych. Jedną z wad stosowania pierwotnych hepatocytów do badań toksykologicznych jest utrata fenotypu po niedługim czasie w hodowli. Funkcje specyficzne dla

wątroby, takie jak wytwarzanie albumin i ekspresja enzymów cytochromu P450, zostają utracone już w ciągu pierwszych 24–48 godzin hodowli [15, 16].

Skrawki wątroby (liver slices)

W tym modelu zachowana jest struktura i organizacja różnych typów komórek wątrobowych, co umożliwia ocenę potencjalnej hepatotoksyczności nie tylko poprzez określanie żywotności lub funkcjonalności biochemicznej hepatocytów, ale także przez analizę morfologiczną tkanki.

Powszechne stosowanie ludzkich skrawków wątroby do badań toksyczności jest limitowane przez potrzebę dostarczania świeżej tkanki wątrobowej, ograniczone przeżycie skrawków i brak dobrze przygotowanych protokołów prowadzenia hodowli, co może negatywnie wpływać na powtarzalność oraz odtwarzalność eksperymentów [16].

Mikrosomy

Mikrosomy wątrobowe są modelem do badań biotransformacji leków (profil metaboliczny i przewidywanie klirensu wątrobowego) i badań interakcji lekowych (fenotypowanie i badania potencjału inhibicyjnego). Pozwalają również wykryć potencjalnie reaktywne, toksyczne, metabolity leku.

Frakcja mikrosomalna zawiera enzymy I fazy biotransformacji, mianowicie monooksygenazy cytochromu P450, monooksygenazy zawierające flawinę (FMO), esterazy, amidazy i hydrolazy epoksydowe, a także niektóre enzymy II fazy, takie jak np. UGT – difosfoglukuronozylotransferazę urydyny [17].

Modele 3D

Oparte są na odtwarzaniu mikrośrodowiska panującego *in vivo*, uwzględniającego architekturę komórek 3D, zróżnicowanie komórek, interakcje komórka–komórka i komórka–matryca oraz dynamiczny przepływ składników odżywczych. Wyróżniamy modele oparte na rusztowaniach, wielokomórkowe sferoidy oraz urządzenia mikrofluidalne.

Modele oparte na rusztowaniach

Struktura rusztowania powinna tworzyć porowatą sieć, aby umożliwić perfuzję gazów, składników odżywczych i czynników wzrostu oraz mieć odpowiednie właściwości mechaniczne. Struktury te mogą być wytwarzane z szerokiej gamy materiałów, naturalnych biomateriałów albo syntetycznych polimerów. Jednym z najpowszechniej stosowanych naturalnych biomateriałów w inżynierii tkankowej wątroby jest

alginian (materiał biokompatybilny, o niskiej toksyczności) [16].

- **Model liver on chips** – wykorzystanie technologii mikroprzepływu (patrz: nefrotoksyczność – model kidney-on-a-chip).

Nefrotoksyczność

Nerki to jeden z głównych organów wydalania, w naturalny sposób narażony na efekty toksyczne wywołane przez leki. Mechanizm działania toksycznego leków na komórki nerki może polegać na:

- uszkodzeniu błony komórkowej,
- wywoływaniu stresu oksydacyjnego poprzez generowanie wolnych rodników tlenowych,
- aktywacji procesów zapalnych,
- zakłóceniu czynności naczyniowej nerek [18].

Nefrotoksyczność wywołana lekami może prowadzić do ostrego uszkodzenia nerek (*acute kidney injury*, AKI) lub przewlekłej choroby nerek [19].

Tradycyjną metodą przedklinicznych badań nefrotoksyczności jest podawanie badanej substancji ssakom (badanie *in vivo*). Ostre, podostre i przewlekłe objawy toksyczności są klasycznie oceniane u dwóch gatunków zwierząt (jednego gryzonia i drugiego niebędącego gryzoniem). Modele te są kosztowne i czasochłonne, dlatego nie jest praktyczne stosowanie ich do przesiewowego badania nefrotoksyczności dużej liczby próbek [18].

Leki mogą wywierać toksyczne działanie na różne cele w nerkach. Kanalik bliższy (proksymalny) jest szczególnie interesujący dla badań dotyczących nefrotoksyczności, ponieważ aktywny klirens, resorpcja, stężenie wewnątrzkomórkowe i kumulacja leków występują głównie w tym obszarze w nerce. Ciągła ekspozycja bliższego kanalik na wysokie stężenie leków i ich toksyczne metabolity, w połączeniu z wysokim zapotrzebowaniem na energię komórek nabłonkowych w tym regionie, czyni go szczególnie podatnym na szkodliwe bodźce. W związku z tym komórki kanalik proksymalnego stanowią jeden z podstawowych modeli *in vitro* do badań nefrotoksyczności [20].

Tabela 2. Linie komórkowe wykorzystywane w badaniach nefrotoksyczności [21]

Linia komórkowa	Tkanka, z której linia została wyprowadzona	Pochodzenie
HK-2	nabłonek kanalik proksymalnego	człowiek
hRPTEC	nabłonek kanalik proksymalnego	człowiek
hRPTEC/TERT1	nabłonek kanalik proksymalnego	człowiek
NRK-52E	nabłonek kanalik proksymalnego	szczur
OK	nabłonek kanalik proksymalnego	opos
MDCK	nabłonek kanalik dystalnego	pies

W celu uzyskania wystarczającej korelacji z nefrotoksycznością *in vivo* komórki w hodowli powinny spełniać następujące warunki:

- zachować polarność;
- formować nabłonek z charakterystycznymi połączeniami międzykomórkowymi (*tight junction*);
- zachować cechy charakterystyczne dla nefronu, takie jak produkcja glutationu, transport przynabłonkowy oraz obecność typowych enzymów [21] (tabela 2).

Jednoczesne spełnienie tych warunków w hodowli jest jednak bardzo trudne i wymaga stałego procesu monitorowania hodowli.

W badaniach nefrotoksyczności dużą trudność stanowi fakt, że testy prowadzone w oparciu o modele komórkowe pozwalają raczej na wykrywanie nieswoistej cytotoxyczności niż nefrotoksyczności, która jest efektem specyficznego stresu dla nerki. Obecnie większą uwagę poświęca się detekcji charakterystycznych biomarkerów, świadczących o uszkodzeniu bądź niewydolności nerek (np. białko NGAL (*Neutrophil-Gelatinase Associated Lipocalin*), KIM-1 (*Kidney Injury Molecule-1*) markery te są niewykrywalne w zdrowej nerce ani w moczu) [22, 23].

Model 3D – kidney-on-a-chip

Większość tych modeli opiera się na materiałach matrycowych, takich jak naturalne lub syntetyczne polimery, które zasiedla się komórkami (np. komórki kanalik bliższego wyizolowane z mysich nerek).

Model *kidney-on-a-chip* stanowi wielowarstwowe urządzenie mikrofluidalne, zawierające kanał mikroprzepływowy i porowate podłoże membranowe, pokryte ludzkimi komórkami nabłonkowymi nerki eksponowanymi na przepływ płynu. Ekspozycja pojedynczej warstwy nabłonka na dynamikę przepływającego nad hodowlą płynu powoduje polepszoną polaryzację komórek nabłonka [24].

Model *kidney-on-a-chip* pozwala dokładniej naśladować środowisko nerek w warunkach *in vivo*, w szczególności właściwości przepływu płynu w nerce. Dzięki temu możliwe jest precyzyjne odwzorowanie sytuacji panującej *in vivo*, a tym samym dokładniejsza ocena bezpieczeństwa potencjalnego leku względem organu [25].

Neurotoksyczność

Jest definiowana jako tymczasowe bądź trwałe uszkodzenie mózgu, rdzenia kręgowego lub struktur obwodowego układu nerwowego, czego objawem może być m.in. upośledzenie funkcji

poznawczych, zespoły mózdkowe, zaburzenia nerwowo-mięśniowe, neuronopatie. Wybór odpowiedniego systemu neuronalnego *in vitro* zależy od konkretnych punktów końcowych, warunkowanych przez naturę zjawisk neurotoksycznych (degeneracja elementów cytoplazmy neuronu, degeneracja aksonów lub dendrytów, demielinizacja, wpływ na przewodnictwo) [26].

Testy do badań neurotoksyczności (analizujące m.in. zdolność do proliferacji, migracji, formowania synaps, przepływu jonów bądź mielinizacji) oparte są na hodowlach komórek ssaczych, o różnym stopniu złożoności oraz o modele wykorzystujące zwierzęta inne niż ssaki (**danio przegony, jeżowiec morski, nicień *Caenorhabditis elegans***) [27].

Biorąc pod uwagę złożoność układu nerwowego i wiele aspektów możliwych skutków neurotoksycznych, bardzo mało prawdopodobne jest, aby pojedynczy test obejmował badanie pełnego spektrum zmian toksycznych w obrębie OUN. Proponuje się rozwiązania wykorzystujące zbiór testów, który obejmuje testy *in vitro* z wykorzystaniem komórek ssaków i jeden lub dwa testy z modelami innymi niż ssacze.

Modele komórek ssaczych

Linie komórkowe

- PC12 (szczurze nadnerczowe komórki guza chromochłonnego); w obecności czynników wzrostu nerwów (NGF) różnicują się do komórek podobnych do neuronów współczulnych, wykazują takie cechy, jak: pobudliwość elektryczna, wydzielanie neuroprekursorów (dopamina, noradrenalina), ekspresja receptorów cholinergiczych, jonotropowych (NMDA) i ekspresja esteraazy acetylocholinowej.
- B50, IMR-32, SH-SY5Y, SK-N-SH, wywodzące się z nerwiaka zarodkowego (neuroblastoma) [28, 29].

Neuronalne pierwotne hodowle

Mogą pochodzić z wielu różnych regionów, m.in. zwojów grzbietowych, hipokampa, kory mózgowej, mózdku, śródmózgowia. W badaniach wykorzystuje się m.in.:

- komórki ziarniste mózdku
Hodowla może być neuronalno-glejowa, kiedy składa się z około 85% neuronów, 15% astrocytów i 5% mikrogleju lub prawie wyłącznie neuronalna, którą uzyskuje się przez dodanie czynników blokujących proliferację glejową. Hodowle komórek ziarnistych mózdku składają się głównie z neuronów ziarnistych, głównie glutaminergiczych i cechują się wysoką ekspresją receptorów NMDA.

- hodowle neuronów korowych

Składają się z neuronów, astrocytów, oligodendrocytów i komórek mikrogleju. Hodowlę uznaje się za dojrzałą po około 3-4 tygodniach w kulturze i można ją utrzymywać przez wyjątkowo długi czas (kilka miesięcy) [30].

Nerwowe komórki macierzyste oraz komórki progenitorowe

Nerwowe komórki macierzyste (NSC) lub komórki progenitorowe mają zdolność samoodnowy i mogą generować wszystkie trzy główne typy komórek OUN: neurony, astrocyty i oligodendrocyty. Mogą pochodzić z różnych gatunków, w tym gryzoni i ludzi. Trzy główne źródła komórek macierzystych to: pluripotencjalne embrionalne komórki macierzyste wyizolowane z blastocysty, ludzkie komórki macierzyste krwi pępowinowej i multipotencjalne somatyczne komórki progenitorowe pochodzące ze szpiku kostnego lub innych tkanek, w tym OUN.

Model ten może służyć do badania neurotoksyczności w całym zakresie procesów neurorozwojowych, takich jak: proliferacja, migracja, różnicowanie, synaptogeneza i apoptoza [30, 31].

Model bariery krew-mózg

Ważnym aspektem działania oraz toksyczności leków jest zdolność do przenikania przez barierę krew-mózg (*brain-blood barrier*, BBB), która odgrywa kluczową rolę w utrzymaniu homeostazy OUN. Bariera z jednej strony ogranicza transport z krwi do mózgu potencjalnie szkodliwych substancji, z drugiej zaś pełni funkcję nośnika – odpowiedzialna jest za transport substancji odżywczych do mózgu i usuwanie metabolitów.

Modele *in vitro* BBB opierają się głównie na hodowli komórek śródbłonna. Wykorzystuje się również kohodowle, w których komórki śródbłonna hodowane są wspólnie z astrocytami i/lub pericytami, które odpowiadają typom komórek naturalnie tworzących BBB [32].

Kardiotoksyczność

Kardiotoksyczność jest ciężkim działaniem niepożądanym leków, obejmującym zarówno bezpośrednie uszkodzenie serca, jak i pośrednie skutki wynikające ze zmiany środowiska hemodynamicznego lub zdarzeń zakrzepowych. Toksyczność leku względem układu sercowo-naczyniowego może być związana między innymi z:

- bezpośrednim uszkodzeniem mitochondriów,
- przerwaniem szlaków sygnałowych kinaz,
- zahamowaniem sercowych kanałów jonowych.

Modele *in vitro* do badań kardiotoksyczności obejmują m.in. hodowle pierwotne kardiomiocytów, immortalizowane linie komórek sercowych

oraz układy, w których wykorzystuje się komórki niewywodzące się z kardiomiocytów, np. ludzkie komórki embrionalne nerki (*Human Embryonic Kidney*, HEK) i komórki jajnika chomika chińskiego (*Chinese Hamster Ovary*, CHO), ze stabilną ekspresją kanału hERG (kanał hERG ma kluczowe znaczenie dla repolarizacji potencjału czynnościowego serca, a hamowanie jego funkcji powoduje wydłużenie potencjału czynnościowego komorowego i wydłużenie odstępu QT – efektem tego może być arytmia, co w przypadku leków niekardiologicznych stanowi istotne działanie niepożądane).

Z powodzeniem stosowane są także komórki macierzyste i hiPSC, które mają zdolność przekształcania się funkcjonalne kardiomiocyty pochodzenia ludzkiego oraz modele 3D (sferoidy, modele *heart-on-a-chip*) [33, 34].

Mutagenność i genotoksyczność

Do oceny aktywności mutagennej i genotoksycznej substancji chemicznych stosowane są różnego rodzaju modele komórkowe, wykorzystujące zarówno komórki bakterii, jak i hodowle komórek ssaczych [35].

Złoty standard w badaniu potencjału mutagennego – test Amesa

Prosta budowa komórek bakterii, ich częste podziały komórkowe, umożliwiające szybkie namnażanie, a także stosunkowa łatwość hodowli i podatność na modyfikacje genetyczne to cechy przemawiające na korzyść użycia modeli prokariotycznych w badaniach screeningowych właściwości mutagennych i genotoksycznych substancji chemicznych [36].

Test Amesa wykorzystuje zmodyfikowane szczepy bakteryjne *Salmonella typhimurium*, posiadające mutacje w operonie histydy. Mutanty *his⁻* nie mają zdolności do syntezy aminokwasu histydy, dlatego nie są zdolne do wzrostu na pożywce minimalnej, pozbawionej L-histydy [37]. Zdolność do wzrostu na pożywce bez histydy może zmutowanym komórkom bakteryjnym przywrócić mutacja powrotna (rewersja) do form prototroficznych o fenotypie *his⁺*. W teście Ames'a określa się zdolność do wywoływania przez badaną substancję (kandydata na lek) mutacji powrotnych, czyli reversji.

Szczepy testowe wykorzystywane w teście Ames'a posiadają również dodatkowe mutacje:

- *Rfa*, która zwiększa przepuszczalność błony komórkowej w wyniku zmiany jej składników lipopolisacharydowych;
- delecja *uvrB*, która zmniejsza zdolność naprawy materiału genetycznego, polegającej na

wycinaniu uszkodzonych fragmentów i zastępowaniu ich prawidłowymi

lub są transfekowane plazmidem pKM101, który warunkuje oporność bakterii na ampicylinę oraz zawiera gen *mucAB*, powodujący aktywację systemu błędnej naprawy DNA. Plazmid pKM101 zwiększa czułość szczepów testowych na wykrywanie mutacji indukowanych przez nitrowe i aminowe pochodne wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych.

Autorzy testu zalecali stosowanie pięciu szczepów bakterii: TA 1535, TA 1537, TA 1538, TA 98 oraz szczep TA 100. W aktualnie prowadzonych badaniach standardowo zaleca się stosowanie zestawu czterech szczepów, tj.: TA 97 (szczep wrażliwy na czynniki utleniające), szczep TA 98, TA 100 oraz TA 102, które są wrażliwe na większą liczbę mutagenów niż szczep TA 1537.

W teście Amesa można badać potencjał mutageny metabolitów, powstających w toku biotransformacji badanego związku. Bakterie, które wykorzystywane są w teście Amesa nie zawierają całego zestawu monooksygenaz, które występują u organizmów wyższych. Dlatego niemożliwe jest wykrycie właściwości mutagennych substancji, które wymagają aktywacji metabolicznej. Aktywację tych związków przeprowadza się poprzez inkubację z tzw. frakcją S9, będącą homogenatem pochodzącym z wątroby szczura. Frakcja S9 zawiera większość monooksygenaz i innych enzymów, które są niezbędne do aktywacji metabolicznej potencjalnych mutagenów.

Test mikrojądrowy *in vitro* – biomarker skutków narażenia organizmu na czynniki genotoksyczne

Test mikrojądrowy polega na wizualizacji mikrojąderek – struktur powstających na skutek nieprawidłowości, jakie zachodzą podczas podziału komórki. Tworzenie mikrojadek związane jest z chromosomowymi aberracjami: utratą chromosomu lub ubytkiem fragmentu chromosomu. Utracone podczas podziału komórki chromosomy lub ich fragmenty tworzą w cytoplazmie charakterystyczne struktury o zaokrąglonym kształcie.

Istnieje wiele protokołów opisujących procedurę wykonania testu mikrojądrowego, jednak jedną z uznanych metod jest ta wskazana przez wytyczną OECD 487. W warunkach *in vitro* test mikrojądrowy wykonywany jest na linii CHO-K1 (komórki jajnika chomika chińskiego) w obecności cytochalaminy B, czynnika który zatrzymuje podział komórki na etapie cytokinezy. Wizualizacja mikrojadek oparta jest o barwienie przyżyciowe komórek za pomocą barwników fluorescencyjnych, np. oranż akrydyny lub Hoechst 33258, lub niefluorescencyjnych (barwnik Giemsa) [38, 39].

Podsumowanie

Modele *in vitro* stanowią cenne narzędzie w procesie odkrywania i rozwoju leków. Pozwalają zmniejszyć koszty badań i ryzyko wejścia do fazy klinicznej związków toksycznych. Niewykryta wcześniej toksyczność może spowodować nie tylko wycofanie leku z procesu wchodzenia na rynek, ale przede wszystkim kosztować życie wielu ludzi. Modele *in vitro* pozwalają przewidywać potencjał genotoksyczny, hepatotoksyczny, nefrotoksyczny, neurotoksyczny czy kardiotoxyczny badanych substancji i eliminować niebezpiecznych kandydatów na leki bez narażania ludzi i zwierząt.

Otrzymano: 2018.01.04 · Zaakceptowano: 2018.01.15

Piśmiennictwo

- Brodniewicz T., Grynkiewicz G.: Preclinical drug development. *Acta Pol Pharm.* 2010, 67(6): 578–85.
- Freires I.A., Sardi J.C., de Castro R.D., Rosalen P.L.: Alternative Animal and Non-Animal Models for Drug Discovery and Development: Bonus or Burden? *Pharm Res.* 2017, 34(4): 681–686.
- Törnqvist E., Annas A., Granath B., Jalkestén E., Cotgreave I., Öberg M.: Strategic Focus on 3R Principles Reveals Major Reductions in the Use of Animals in Pharmaceutical Toxicity Testing. *Eller K, ed. PLoS ONE.* 2014, 9(7): e101638.
- Donglu Z., Gang L., Xinxin D., Chuang L.: Preclinical experimental models of drug metabolism and disposition in drug discovery and development, In *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2012, 2(6): 549–561.
- Brunner D., Frank J., Appl H., Schöffl H., Pfaller W., Gstraunthaler G.: Serum-free cell culture: the serum-free media interactive online database. *ALTEX.* 2010, 27(1): 53–62.
- Méry B., Guy J.B., Vallard A., Espenel S., Ardail D., Rodriguez-Lafrasse C., Rancoule C., Magné N.: In Vitro Cell Death Determination for Drug Discovery: A Landscape Review of Real Issues. *J Cell Death.* 2017, 10: 1179670717691251.
- Kunz-Schughart L.A., Freyer J.P., Hofstaedter F., Ebner R.: The use of 3-D cultures for high-throughput screening: the multicellular spheroid model. *J Biomol Screen.* 2004, 9(4): 273–85.
- Edmondson R., Broglie J.J., Adcock A.F., Yang L.: Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay Drug Dev Technol.* 2014, 12(4): 207–218.
- Zanoni M., Piccinini F., Arienti C., Zamagni A., Santi S., Polico R., Bevilacqua A., Tesi A.: 3D tumor spheroid models for in vitro therapeutic screening: a systematic approach to enhance the biological relevance of data obtained. *Sci Rep.* 2016, 11(6): 19103.
- Mazzoleni G., Steimberg N.: New Models for the In Vitro Study of Liver Toxicity: 3D Culture Systems and the Role of Bioreactors, 2012.
- Godoy P et al.: Recent advances in 2D and 3D in vitro systems using primary hepatocytes, alternative hepatocyte sources and non-parenchymal liver cells and their use in investigating mechanisms of hepatotoxicity, cell signaling and ADME. *Arch Toxicol.* 2013, 87(8): 1315–1530.
- Bale S.S. et al.: In vitro platforms for evaluating liver toxicity. *Exp Biol Med (Maywood)* 2014, 239(9): 1180–1191.
- Anene-Nzulu C., Wang Y., Yu H., Liang L.H.: Liver tissue model for drug toxicity screening. *Journal of Mechanics in Medicine and Biology* 2011, 11(2): 369–390.
- Soldatow V.Y., LeCluyse E.L., Griffith L.G., Rusyn I.: In vitro models for liver toxicity testing. *Toxicology research* 2013, 2(1): 23–39.
- Zeilinger K., Freyer N., Damm G., Seehofer D., Knöspel F.: Cell sources for in vitro human liver cell culture models. *Experimental Biology and Medicine* 2016, 241(15): 1684–1698.
- Gómez-Lechón M.J., Lahoz A., Gombau L., Castell J.V., Donato M.T.: In vitro evaluation of potential hepatotoxicity induced by drugs. *Curr Pharm Des.* 2010, 16(17): 1963–77.
- Fang X., Zhang P., Qiao L., Feng X., Zhang X., Girault H.H., Liu B.: Efficient drug metabolism strategy based on microsome-mesoporous organosilica nanoreactors. *Anal Chem.* 2014, 86(21): 10870–10876.
- Davies J.A.: Self-organized Kidney Rudiments: Prospects for Better in vitro Nephrotoxicity Assays. *Biomark Insights.* 2015, 10(Suppl 1): 117–123.
- Tiong H.Y., Huang P., Xiong S., Li Y., Vathsala A., Zink D.: Drug-induced nephrotoxicity: clinical impact and preclinical in vitro models. *Mol Pharm.* 2014, 11(7): 1933–1948.
- Ouedraogo M., Baudoux T., Stévigny C., Nortier J., Colet J.M., Efferth T., Qu F., Zhou J., Chan K., Shaw D., Pelkonen O., Duez P.: Review of current and “omics” methods for assessing the toxicity (genotoxicity, teratogenicity and nephrotoxicity) of herbal medicines and mushrooms. *J Ethnopharmacol.* 2012, 140(3): 492–512.
- Huang J.X., Blaskovich M.A., Cooper M.A.: Cell- and biomarker-based assays for predicting nephrotoxicity. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2014, 10(12): 1621–1635.
- Su R., Xiong S., Zink D., Loo L.H.: High-throughput imaging-based nephrotoxicity prediction for xenobiotics with diverse chemical structures. *Arch Toxicol.* 2016, 90(11): 2793–2808.
- Kim S.Y., Sohn S.J., Won A.J., Kim H.S., Moon A.: Identification of non-invasive biomarkers for nephrotoxicity using HK-2 human kidney epithelial cells. *Toxicol Sci.* 2014, 140(2): 247–258.
- Jang K.J., Mehr A.P., Hamilton G.A., McPartlin L.A., Chung S., Suh K.Y., Ingber D.E.: Human kidney proximal tubule-on-a-chip for drug transport and nephrotoxicity assessment. *Integr Biol (Camb)* 2013, 5(9): 1119–1129.
- An F., Qu Y., Liu X., Zhong R., Luo Y.: Organ-on-a-Chip: New Platform for Biological Analysis. *Analytical Chemistry Insights.* 2015, 10: 39–45.
- Segura-Aguilar J., Kostrzewa R.M.: Neurotoxins and neurotoxicity mechanisms. An overview. *Neurotox Res.* 2006 Dec, 10(3–4): 263–287.
- Peterson R.T., Nass R., Boyd W.A., Freedman J.H., Dong K., Narahashi T.: Use of non-mammalian alternative models for neurotoxicological study. *Neurotoxicology* 2008, 29(3): 546–555.
- Costa L.G., Giordano G., Guizzetti M.: Predictive models for neurotoxicity assessment. In *Predictive Toxicology in Drug Safety*. Vol. 9780521763646. Cambridge University Press. 2010: 135–152.
- Heusinkveld H.J., Westerink R.H.S.: Comparison of different in vitro cell models for the assessment of pesticide-induced dopaminergic neurotoxicity. *Toxicol In Vitro* 2017, 45(Pt 1): 81–88.
- Höglberg H.: Developmental Neurotoxicity Testing Using In vitro Approaches [Internet] [PhD dissertation]. [Stockholm]: The Wenner-Gren Institute, Stockholm University; 2009. Available from: <http://urn.kb.se/resolve?urn=urn:nbn:se:su:diva-30056>.
- Tofighi R., Moors M., Bose R., Ibrahim W.N., Ceccatelli S.: Neural stem cells for developmental neurotoxicity studies. *Methods Mol Biol.* 2011, 758: 67–80.
- Helms H.C. et al.: In vitro models of the blood-brain barrier: An overview of commonly used brain endothelial cell culture models and guidelines for their use. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2016, 36(5): 862–890.
- Donglu Zhang, Gang Luo, Xinxin Ding, Chuang Lu: Preclinical experimental models of drug metabolism and disposition in drug discovery and development, In *Acta Pharmaceutica Sinica B* 2012, 2(6): 549–561.
- Sun W, Cardiotoxicity Testing in Drug Development, *SM J Cardiovasc Dis.* 2016, 1(1): 1005.
- Eastmond DA et al., Mutagenicity testing for chemical risk assessment: update of the WHO/IPCS Harmonized Scheme. *Mutagenesis.* 2009, 24(4): 341–349.
- Lan J., Gou N., Gao C., He M., Gu A.Z.: Comparative and mechanistic genotoxicity assessment of nanomaterials via a quantitative toxicogenomics approach across multiple species. *Environ Sci Technol.* 2014, 48(21): 12937–12945.
- Maron D.M., Ames B.N.: Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat Res.* 1983, 113(3–4): 173–215.
- Corvi R., Albertini S., Hartung T. et al.: ECVAM retrospective validation of in vitro micronucleus test (MNT). *Mutagenesis.* 2008, 23(4): 271–283.
- Hatzl VI, Karakosta M, Barszczewska K, Karachristou I, Pantelias G, Terzoudi GI. Low concentrations of caffeine induce asymmetric cell division as observed in vitro by means of the CBMN-assay and iFISH. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 2015, 793: 71–78.